

**Poly-3-hydroxy-butyrate recovery from microbial cells - by digesting non-polymer material with enzyme and/or surfactant****Patent Assignee:** IMPERIAL CHEM IND PLC**Inventors:** HOLMES P A; LIM G B**Patent Family (8 patents, 10 countries)**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
<a href="#">EP 145233</a>	A	19850619	EP 1984307542	A	19841101	198525	B
<a href="#">JP 60145097</a>	A	19850731	JP 1984246975	A	19841121	198537	E
<a href="#">EP 145233</a>	B	19880622	EP 1984307542	A	19841101	198825	E
<a href="#">DE 3472271</a>	G	19880728				198831	E
<a href="#">US 4910145</a>	A	19900320	US 1989374567	A	19890630	199017	E
<a href="#">EP 145233</a>	B2	19911106				199145	E
<a href="#">JP 1992061638</a>	B	19921001	JP 1984246975	A	19841121	199244	E
<a href="#">CA 1320164</a>	C	19930713	CA 498397	A	19851220	199334	NCE

**Priority Application Number (Number Kind Date):** CA 498397 A 19851220; GB 198331199 A 19831123; GB 198411670 A 19840508

**Patent Details**

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
<a href="#">EP 145233</a>	A	EN	33	0	
Regional Designated States, Original	BE CH DE FR GB IT LI NL SE				
<a href="#">EP 145233</a>	B	EN			
Regional Designated States, Original	BE CH DE FR GB IT LI NL SE				

EP 145233	B2	EN		
Regional Designated States, Original	CH DE FR GB IT LI NL SE			
JP 1992061638	B	JA	14	Based on OPI patent JP 60145097
CA 1320164	C	EN		

**Alerting Abstract: EP A**

Recovery of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from PHB-contg. microbial cells is effected by digesting an aq. suspension of the cells with at least one solubilising agent to solubilise non-PHB material, and separating the insoluble PHB-contg. residue.

The digestion step includes one or more stages in which the solubilising agent is a proteolytic enzyme and/or a surfactant, and the suspension is heated above 80 deg.C before or during the digestion step and before any proteolytic enzyme digestion stage. Also claimed is a compsn. comprising at least 90 wt.% PHB and at least 1 wt.% peptidoglycan.

USE/ADVANTAGE - PHB is a thermoplastic polymer, e.g. useful as a moulding material. The treatment removes the bulk of non-PHB material without incurring the large solvent losses associated with conventional solvent extn. (cf.EP15123).

**Equivalent Alerting Abstract:**

US A

Non 3-hydroxybutyrate polymer cell material is removed from bacterial cells, by (a) heating an aq. suspension of cells above 80 deg.C to lyse cells; (b) digesting them with a proteolytic enzyme and/or surfactant to solubilise non-hydroxybutyrate polymer; and (c) sepg. water-insoluble residue contg. 3-hydroxybutyrate polymer from soln. obtd.

Solubilising agent comprises proteolytic enzyme, and heating takes place before digestion. Pref. enzyme comprises a phospholipase.

USE - To isolate poly(3-hydroxybutyrate) as an energy reserve material. @(11pp)

**International Classification (Main):** C12P-007/62 **(Additional/Secondary):** C08G-063/06, C08G-063/72, C12N-001/06, C12P-007/52, C12P-007/64, C12R-001/01, C12R-001/05, C12R-001/065, C12R-001/07, C12R-001/365, C12R-001/38, C12R-001/41

**US Classification, Issued:** 435259000, 435134000, 435141000, 435271000, 435829000, 435874000

### **Canada**

Publication Number: CA 1320164 C (Update 199334 NCE)

Publication Date: 19930713

Assignee: IMPERIAL CHEM IND PLC (ICIL)

Inventor: HOLMES P A LIM G B

Language: EN

Application: CA 498397 A 19851220 (Local application)

Priority: CA 498397 A 19851220 (Local application)

Original IPC: C12P-7/62(A) C12N-1/06(B)

Current IPC: C12P-7/62(A) C12N-1/06(B)

### **Germany**

Publication Number: DE 3472271 G (Update 198831 E)

Publication Date: 19880728

Language: DE

Priority: GB 198331199 A 19831123 GB 198411670 A 19840508

### **European Patent Office**

Publication Number: EP 145233 A (Update 198525 B)

Publication Date: 19850619

**\*\*Trennungsverfahren Separation process Procede de separation\*\***

Assignee: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC, Imperial Chemical House Millbank, London SW1P 3JF, GB (ICIL)

Inventor: Holmes, Paul Arthur, The Chestnuts Thornton-le-Beans, Northallerton North Yorkshire, GB  
Lim, Guan Boh, 14 Falcon Lane Norton, Stockton-on-Tees Cleveland, GB

Agent: Gratwick, Christopher, et al, Imperial Chemical Industries PLC Legal Department: Patents PO Box 6 Bessemer Road, Welwyn Garden City Herts, AL7 1HD, GB

Language: EN (33 pages, 0 drawings)

Application: EP 1984307542 A 19841101 (Local application)

Priority: GB 198331199 A 19831123 GB 198411670 A 19840508

Designated States: (Regional Original) BE CH DE FR GB IT LI NL SE

Original IPC: C08G-63/06 C12N-1/06 C12P-7/62

Current IPC: C08G-63/06 C12N-1/06 C12P-7/62

Original Abstract: Separation process. An aqueous suspension of micro-organism cells containing a 3-hydroxybutyrate polymer are subjected to a proteolytic enzyme digestion and/or a surfactant digestion in order to solubilise cell material other than the 3-hydroxybutyrate polymer. Prior to, or during the digestion, but before any proteolytic enzyme digestion step, the suspension is heated to at least 80(deg)C to denature nucleic acids which otherwise hinder separation of the 3-hydroxybutyrate polymer containing residue from the suspension.

Claim: Recovery of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from PHB-contg. microbial cells is effected by digesting an aq. suspension of the cells with at least one solubilising agent to solubilise non-PHB

material, and separating the insoluble PHB-contg. residue. The digestion step includes one or more stages in which the solubilising agent is a proteolytic enzyme and/or a surfactant, and the suspension is heated above 80 deg.C before or during the digestion step and before any proteolytic enzyme digestion stage. Also claimed is a compsn. comprising at least 90 wt.% PHB and at least 1 wt.% peptidoglycan.[EP 145233 B (Update 198825 E)

Publication Date: 19880622

**\*\*Trennungsverfahren fuer ein 3-hydroxybutyrat-Polymer Separation process for a 3-hydroxybutyrate polymer Procédé de séparation pour un polymère de butyrate-3-hydroxy\*\***

Assignee: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC, Imperial Chemical House Millbank, London SW1P 3JF, GB

Inventor: Holmes, Paul Arthur, The Chestnuts Thornton-le-Beans, Northallerton North Yorkshire, GB  
Lim, Guan Boh, 14 Falcon Lane Norton, Stockton-on-Tees Cleveland, GB

Agent: Gratwick, Christopher, et al, Imperial Chemical Industries PLC Legal Department: Patents PO Box 6 Bessemer Road, Welwyn Garden City Herts, AL7 1HD, GB

Language: EN

Application: EP 1984307542 A 19841101 (Local application)

Priority: GB 198331199 A 19831123 GB 198411670 A 19840508

Designated States: (Regional Original) BE CH DE FR GB IT LI NL SE

Original IPC: C12P-7/62 C08G-63/06 C08G-63/72

Current IPC: C12P-7/62(A) C08G-63/06 C08G-63/72

Claim: A process for the removal of non 3-hydroxybutyrate cell material from microorganism cells contg. a 3-hydroxybutyrate polymer comprising digesting an aq. suspension of the cells with at least one solubilising agent whereby the non polymer cell material in the cells is solubilised and then sepg. the insoluble residue contg. the 3-hydroxybutyrate polymer from the suspension, characterised in that the digestion step includes one or more stages wherein the solubilising agent is a proteolytic enzyme compsn. and at least one stage wherein the solubilising agent is a phospholipase and the suspension is heated to a temp. above 100 deg.C before or during the digestion step and before the proteolytic enzyme digestion stage. (12pp)[EP 145233 B2 (Update 199145 E)

Publication Date: 19911106

Language: EN

Priority: GB 198411670 A 19840508

Designated States: (Regional Original) CH DE FR GB IT LI NL SE

Claim: A process for the removal of non 3-hydroxybutyrate cell material from microorganism cells contg. a 3-hydroxybutyrate polymer comprising digesting an aq. suspension of the cells with at least one solubilising agent whereby the non polymer cell material in the cells is solubilised and then sepg. the insoluble residue contg. the 3-hydroxybutyrate polymer from the suspension, characterised in that the digestion step includes one or more stages wherein the solubilising agent is a proteolytic enzyme compsn. and at least one stage wherein the solubilising agent is a phospholipase and the suspension is heated to a temp. above 100 deg.C before or during the digestion step and before the proteolytic enzyme digestion stage. (12pp)

## Japan

Publication Number: JP 60145097 A (Update 198537 E)

Publication Date: 19850731

Language: JA

Application: JP 1984246975 A 19841121 (Local application)

Priority: GB 198331199 A 19831123 GB 198411670 A 19840508|JP 1992061638 B (Update 199244 E)

Publication Date: 19921001

Assignee: IMPERIAL CHEM IND PLC (ICIL)

Language: JA (14 pages)

Application: JP 1984246975 A 19841121 (Local application)

Priority: GB 198331199 A 19831123 GB 198411670 A 19840508

Related Publication: JP 60145097 A (Based on OPI patent )

Original IPC: C12P-7/62(A) C12P-7/62(C) C12R-1:05(C) C12P-7/62(D) C12R-1:065(D) C12P-7/62(E) C12R-1:07(E) C12P-7/62(F) C12R-1:365(F) C12P-7/62(G) C12R-1:38(G) C12P-7/62(H) C12R-1:41(H) C12P-7/62(I) C12R-1:01(I)

Current IPC: C12P-7/62(A) C12P-7/62(C) C12R-1:05(C) C12P-7/62(D) C12R-1:065(D) C12P-7/62(E) C12R-1:07(E) C12P-7/62(F) C12R-1:365(F) C12P-7/62(G) C12R-1:38(G) C12P-7/62(H) C12R-1:41(H) C12P-7/62(I) C12R-1:01(I)

## United States

Publication Number: US 4910145 A (Update 199017 E)

Publication Date: 19900320

**\*\*Separation process\*\***

Assignee: Imperial Chemical Industries PLC

Inventor: Holmes, Paul A., GB Lim, Guan B.

Agent: Cushman, Darby Cushman

Language: EN

Application: US 1989374567 A 19890630 (Local application)

Priority: GB 198331199 A 19831123 GB 198411670 A 19840508

Original IPC: C12N-1/06 C12P-7/52 C12P-7/64

Current IPC: C12N-1/06(A) C12P-7/52 C12P-7/64

Original US Class (main): 435259

Original US Class (secondary): 435134 435141 435271 435829 435874

Original Abstract: An aqueous suspension of micro-organism cells containing a 3-hydroxybutyrate polymer are subjected to a proteolytic enzyme digestion and/or a surfactant digestion in order to solubilise cell material other than the 3-hydroxybutyrate polymer. Prior to, or during the digestion, but before any proteolytic enzyme digestion step, the suspension is heated to at least 80(deg) C. to denature nucleic acids which otherwise hinder separation of the 3-hydroxybutyrate polymer containing residue from the suspension.

Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 3381278

**REMOVAL OF CELL SUBSTANCE OTHER THAN 3-HYDROXYBUTYRATE POLYMER FROM MICROORGANISM CONTAINING 3-HYDROXYBUTYRATE POLYMER**

**Publication number:** JP60145097

**Publication date:** 1985-07-31

**Inventor:** POORU AASAA HORUMESU; GUAN BOO RIMU

**Applicant:** ICI LTD

**Classification:**

**- international:** *C12P7/62; C12R1/05; C12R1/065; C12R1/07; C12R1/365; C12R1/38; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/62; C12R1/05; C12R1/065; C12R1/07; C12R1/365; C12R1/38*

**- european:**

**Application number:** JP19840246975 19841121

**Priority number(s):** CA19850498397 19851220; GB19830031199 19831123

**Report a data error here**

Abstract not available for JP60145097

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平4-61638

⑬ Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑭公告 平成4年(1992)10月1日
C 12 P 7/62		8114-4B	
//(C 12 P 7/62			
C 12 R 1:05)			
(C 12 P 7/62			
C 12 R 1:065)			
(C 12 P 7/62			
C 12 R 1:07)			
(C 12 P 7/62			
C 12 R 1:365)			
(C 12 P 7/62			
C 12 R 1:38)			
(C 12 P 7/62			
C 12 R 1:41)			
(C 12 P 7/62			
C 12 R 1:01)			

発明の数 1 (全14頁)

⑮発明の名称	3-ヒドロキシブチレートポリマー含有微生物細胞からの3-ヒドロキシブチレートポリマー以外の細胞物質の除去方法		
	⑯特 願 昭59-246975	⑰公 開 昭60-145097	
	⑱出 願 昭59(1984)11月21日	⑲昭60(1985)7月31日	
優先権主張	⑳1983年11月23日㉑イギリス(GB)㉒8331199 ㉓1984年5月8日㉔イギリス(GB)㉕8411670		
⑳発 明 者	ボール・アーサー・ホルメス	イギリス国ティーエス23・1エルビー、クリーブランド、ビルンガム、ビーオー・ボックス 1	
㉑発 明 者	グアン・ポー・リム	イギリス国ティーエス23・1エルビー、クリーブランド、ビルンガム、ビーオー・ボックス 1	
㉒出 願 人	インベリアル・ケミカル・インダストリーズ・ビーエルシー	イギリス国ロンドン市エスダブリュー1ビー・3ジエイエフ、ミルバンク、インベリアル・ケミカル・ハウス(番地なし)	
㉓代 理 人	弁理士 湯浅 恭三	外5名	
審 査 官	鈴木 恵 理 子		

## I

## 2

## ⑳特許請求の範囲

1 3-ヒドロキシブチレートポリマー含有微生物細胞の水性懸濁液を少なくとも1種の可溶化剤で消化することにより該細胞中の3-ヒドロキシブチレートポリマー以外の細胞物質を可溶化させ、次いで3-ヒドロキシブチレートポリマーを含む不溶性残留物を懸濁液から分離することからなる、3-ヒドロキシブチレートポリマー含有微生物細胞からの3-ヒドロキシブチレートポリマー以外の細胞物の除去方法であつて:

(i) その消化工程が、可溶化剤として蛋白質分解酵素組成物を用いる一またはそれ以上の段階

を含み、そして水性懸濁液をその消化工程の前または消化工程中かつその蛋白質分解酵素での消化段階の前に100℃以上の温度にまで加熱すること、

5 (ii) (a)その消化工程が、可溶化剤としてホスホリパーゼを用いる少なくとも一つの段階をも含むか、または(b)酵素での消化後に不溶性残留物を過酸化水素で処理すること、を特徴とする上記方法。

## 10 発明の詳細な説明

本発明は微生物からの3-ヒドロキシブチレートポリマーの分離方法に関する。

ポリ(3-ヒドロキシブチレート)は、多くの微生物、殊に例えばアルカリゲネス(Alcaligenes)、アチオロジウム(Athiorhodium)、アゾトバクター(Azotobacter)、バシルス(Bacillus)、ノカルジア(Nocardia)、シユウドモナス(Pseudomonas)、リゾビウ(Rhizobium)及びスピリリウム(Spirillum)属の細菌によつて、エネルギー備蓄物質として蓄積される熱可塑性ポリエステルであつて、下記式



の繰返し単位からなるものである。

このポリマーは、微生物を、水性培地中でエネルギー及び炭素源としての炭水化物またはメタノールのような適当な基質で培養することによつて都合よく作られる。基質は、もちろん、微生物によつて同化されうるものでなければならない。ポリマーの蓄積を促進するには、培養工程の少なくとも一部分を、微生物の成長のために必須であるけれども該ポリマーの蓄積のためには要求されない栄養素の制限条件下で実施するのが好ましい。適当な培養方法の例は、欧州特許第15669号及び第46344号明細書に記載されている。

3-ヒドロキシブチレート単位とその他のヒドロキシカルボン酸単位(例えば3-ヒドロキシバレレート単位)との両方を含むポリマーも、微生物により産生されうる。従つて、微生物により産生された3-ヒドロキシブチレート残基と3-ヒドロキシバレレート残基を含むヘテロポリマーはウォーレン(Warren)等によつて、「エンビロンメンタル・サイエンス・アンド・テクノロジー」第8巻(1974)、第576~579頁に記載されている。また、欧州特許第52459号及び第69497号明細書に記載されているように、種々なコポリマー類が、特定の基質で微生物を培養することによつて産生されうる。例えばプロピオン酸を基質とすると、コポリマー中に3-ヒドロキシバレレート単位が生じる。

従つて、この明細書において用いる「HBポリマー」なる用語は、ホモポリマーであるポリ(3-ヒドロキシブチレート)のみでなく、上記のようなコポリマー類をも意味するものである(但し、3-ヒドロキシブチレート残基がポリマー類をも意味するものである(但し、3-ヒドロキシ

ブチレート残基がポリマーの少なくとも40モル%、好ましくは少なくとも50モル%をなすものとする)。

HBポリマーを含む細胞は、そのまま成形用材料として(例えば米国特許第3107172号明細書参照)使用できるけれども、普通はポリマーを残部の細胞物質から分離するのが望ましい。

現在までに提案されてきている分離方法も大多数においては、HBポリマーが可溶である溶剤によつて細胞から重合体を抽出し、次いでその重合体溶液(以下「シロップ」と称する)を細胞残渣から分離することがなされる。普通、そのような抽出工程は、細胞を抽出溶剤が透過しうるようになす処理(例えば磨砕、噴霧乾燥)に付した後に、実施される。典型的溶剤抽出法は、欧州特許第15123号明細書に記載されている。

細胞残渣からのシロップの分離は、通常、滲透または遠心分離によつてなされるが、約5重量%以上のポリマーを含むシロップは非常に粘稠である傾向があり、そのために滲透や遠心分離工程を困難にする。HBポリマー以外の分離されるべき細胞物質(以下「NPCN」と称する)の割合が多いときには殊にその困難がある。分離されるべきNPCMの割合は、もちろん、微生物細胞のHBポリマー含量に左右される。

文献には高割合のHBポリマーを含む微生物細胞の報告もなされてきているが、培養操作の経済上の考慮から微生物細胞中のHBポリマーの割合にはしばしば実用上の限度があり、従つてシロップからのNPCMの分離を容易にするに充分なようにシロップを稀釈するには多量の抽出溶剤の使用が必要とされる。そのような稀釈シロップの使用を必要とされ、大型容器の使用が必要とされ、そして多量の溶剤回収コストがかかるのみならず、(比較的効率的な溶剤回収操作法を用いた場合であつても)可成りの溶剤の損失が起こり易い。従つて、5重量%のシロップ濃度を使用する場合、95重量%の溶剤が再使用のために回収されたとしても、1kgのポリマーを抽出するために、1kgの溶剤が損失される。さらに低濃度のシロップ及び/または低効率の溶剤回収操作を用いれば、溶剤が損失される。さらに低濃度のシロップ及び/または低効率の溶剤回収操作を用いれば、溶剤損失量はさらに多くなる。従つて、そのよう



な抽出法は、抽出処理（含：溶剤回収）コストに加うるに、可成りの原料コスト（すなわち不回収溶剤のコスト）がポリマー産生コストに上乗せされることになる。

上記の抽出法においては、HBポリマーは溶剤中への溶解によつて抽出され、NPCMは不溶解のまま残る。しかし若干のNPCM、例えば脂質も、HBポリマー抽出用溶剤に可溶性であることがあり、従つてシロツブ中に存在することがある。そこでもしそのように溶解されたNPCM不純物を含まないHBポリマー製品を得たい場合には、HBポリマーが可溶性でない溶剤を用いての予備抽出工程が、HBポリマー抽出溶剤に可溶な不純物を除去するためにHBポリマーの抽出前に、必要とされ、あるいはHBポリマーはシロツブから、例えば沈殿により、選択的に分離されなければならない。選択分離（例えば沈殿）工程の採用は、溶剤回収操作をさらに複雑化することが多い。

ここに我々は、そのような大量の溶剤の損失やそれに伴う原料コストの増大を引き起こすことなくHBポリマーからNPCMの大部分を分離する方法を案出した。

本発明においては、NPCMのほとんどの部分は可溶化され（好ましくは酵素により）、HBポリマーを不溶状態で残す。

従つて本発明においては、従来と逆の操作が採用される。すなわちNPCM（不純物）を溶解されて、HBポリマーを不溶状態で残す。NPCMの溶解はいくつかの段階で実施しうるので、次第に向上する純度のHBポリマー生成物を得ることができる。もちろん、そのような段階が多くなればなるほど、操作コストは高くなる。HBポリマー生成物のある種の応用については、他の応用に必要とされるよりも低い純度の生成物が許容されうるので、不純物（NPCM）を段階的に抽出することによつて、そのような許容しうる、低純度の生成物を、高純度生成物よりも安価に生産できる。

J.Gen.Microbiology19（1958）第198～209頁には、微生物細胞を次亜鉛素酸ナトリウムのアルカリ性溶液で処理することにより細胞からポリマーを分離することが提案されている。この処理ではNPCMの可溶化がなされるけれども、それと同時にHBポリマーの著しい分解が引き起こさ

れ、HBポリマーが多くの応用に対し不適当にされてしまうことを、我々は発見した。

またHBポリマー類についての多くの学術文献、例えばJ.Bacteriology88（1964年7月）、第60～71頁（特に61頁）、では、微生物細胞をリゾチーム含有溶液中に懸濁し、懸濁液を超音波に付し、次いでグリセルロール上に層状とした懸濁液を遠心分離することにより、HBポリマー顆粒を細胞碎片から分離することからなる、微生物細胞からのHBポリマー顆粒の分離法が提案されている。しかし、そのような酵素は比較的高価でありその操作が大規模運転に向かないばかりでなく、比較的小割合のNPCMが可溶化されるにすぎない。

本発明によれば、HBポリマー含有微生物細胞の水性懸濁液を少なくとも1種の可溶化剤で消化することにより該細胞中のNPCMを可溶化させ、次いでHBポリマーを含む不溶性残留物を懸濁液から分離することからなる、HBポリマー含有微生物細胞からのNPCMの除去方法であつて：可溶化剤として蛋白分解酵素組成物及び／または界面活性剤を用いる一つまたはそれ以上の段階を消化工程が含むこと、そして消化工程の前または消化工程中、及びいずれかの蛋白分解酵素消化の前に懸濁液を80℃以上の温度に加熱することを特徴とする上記NPCM除去方法が提供される。

好ましくは、加熱段階及び消化段階は、初期細胞中のNPCMの少なくとも50重量%を可溶化させ、そして少なくとも70重量%のHBポリマー含量の不溶性残留物を生じさせるに充分なだけ実施される。

NPCMは、普通、核酸類、脂質類、磷脂質類、ヘプチドグリカン、蛋白質物質（グリコ蛋白を含む）、及び若干の場合には多糖類、ならびにその他の炭化物類からなる。蛋白性物質は普通、NPCMの少なくとも40重量%をなす。

本発明の方法においては、上記のNPCM成分の少なくともいくつかが可溶化される。これは、細胞を、可溶化剤によつて1またはそれ以上の段階で消化することによつてなされる。少なくとも1つの段階における可溶化剤は酵素組成物であるのが好ましく、そして消化工程は、ペプシン、トリプシン、プロメルイン、パパイン、フィシン、レミン、キモトリプシン、及び細菌または真菌の蛋

白分解酵素あるいはそれらの混合物のような、蛋白分解酵素で懸濁液を処理する少なくとも1つの段階を含むのが好ましい。適当な酵素組成物は、「微生物学的」(酵素配合)洗剤粉末に普通使用されているものである。

少なくとも1つの消化段階における可溶化剤は蛋白分解酵素及び/または界面活性剤(殊にアニオン系界面活性剤)である。

消化工程の前もしくは消化工程中、しかしいずれかの蛋白分解酵素による消化工程の前に、細胞は80℃以上の温度に付される。そのような加熱工程は細胞中の核酸類のいくつかの変性及び可溶化を引き起こす。そのよう加熱工程を省くと、蛋白分解酵素消化工程後の不溶性残留物の満足すべき分離ができなくなる。なんとすれば、そのような予備加熱工程がなされないと、核酸類が細胞から放出され、細胞が蛋白分解酵素で消化される際に非常に粘稠な懸濁液を与えるからである。そのような核酸類は蛋白分解酵素での処理前にデオキシリボヌクレアーゼを添加することにより可溶化しうるであろうが、比較的高価なデオキシリボヌクレアーゼの高濃度が必要とされる。同様に蛋白分解酵素での処理後にデオキシリボヌクレアーゼで処理することは、そのデオキシリボヌクレアーゼと粘稠な懸濁液との混合が困難であるので、実用的でない。

消化工程が蛋白分解酵素での消化処理を含む場合には、懸濁液を100℃以上加熱するのが好ましく、殊に水性媒を液体状態に維持するに足る大気圧以上の圧力の下で120℃以上に加熱し、次いでその圧力を、(例えば加熱懸濁液を水性媒が蒸発する圧力に保持した領域中へ押出すことにより、または懸濁液を単に冷却することにより)低減させるのが好ましい。

核酸類の可溶化及び変性を行なうのに必要とされる熱処理時間は、使用温度により変ることになる。従つて、その必要時間は、懸濁液が付される温度が高いほど、短縮される。少なくとも5分間、好ましくは少なくとも10分間の加熱が約100℃の温度において必要とされうるが、さらに高い温度例えば150℃においては、一層短い加熱時間を使用することができ、20秒間というような短い加熱時間を使用することもある。可溶化剤として界面活性剤を用いるいずれの消化段階も、普通

は、界面活性剤による迅速な可溶化を行なうためには80℃以上の温度で実施される。

核酸類の変性及び可溶化を行なう加熱工程のためには広範囲のpH条件を使用できるけれども、そのpH条件はHBポリマーの分解のおそれを最小化するには中性付近、例えばpH 6~8であるのが好ましい。

前述の、本発明の好ましい一態様においては、可溶化の少なくとも一部分は、酵素組成物での細胞の消化によりなされ、特に、可溶化剤として蛋白分解酵素組成物を用いる少なくとも1つの消化段階を採用することによりなされる。

多くの酵素組成物は60℃以上の温度で変性される傾向があるので、核酸を変性及び可溶化させるための加熱工程は、酵素組成物での処理に先立つて実施される。

酵素消化工程を採用する場合に、その消化は当該酵素が変性される温度よりも低い温度で実施されるべきである。多くの場合に、変性温度は65℃よりも低いであろうが、若干の酵素については変性温度がそれよりも高く、従つてそのような酵素を用いるときには65℃よりも高い消化温度を使用しうる。その消化温度は80℃以下であるのが好ましい。酵素が60℃以上の温度に耐えうる場合を除いて、消化は60℃以下、特に50~60℃の温度で実施するのが好ましい。酵素消化工程を採用する場合、懸濁液は酵素消化段階で使用される温度よりも高い温度に通常は加熱されるから、普通は酵素消化に先立つて細胞の冷却が必要とされることになる。細胞は、例えば逡過または遠心分離によつて、加熱懸濁液から分離し、次いで別の水性媒に再懸濁してよく、あるいは加熱懸濁を単に所要の消化温度にまで冷却し、それに対して酵素消化工程を行なうこともできる。

酵素消化によつてもたらされる可溶化NPCMは、所望ならば、追加量のHBポリマー含有微生物の培養のための基質の一部として再使用し、かくしてHBポリマー含有微生物の生産における原料コストの節減を行なうことができる。酵素によつて可溶化されたNPCMは培養工程へ再循環させてもよい(但し必要とされうる滅菌処理のような処理の後)。

従つて可溶化は酵素によつてなされるのが好ましい。酵素消化後の残る残留物中のNPCMをさ

らに可溶化させることは、可溶化剤として界面活性剤を用いて実施しうる。

可溶化を、可溶化剤として蛋白分解酵素組成物及び界面活性剤の両者を用いて実施する場合、消化はいくつかの段階で実施し、界面活性剤消化段階を酵素消化段階（単または複数）の後に実施するのが好ましい。その理由には二つあり、第1は酵素組成物が界面活性剤により失活することがあることであり、第2は、微生物懸濁液を作るために用いられる培養工程へ可溶化NPCMを再循環させようとする場合、懸濁液の可溶化部分中に界面活性剤が存在すると、そのような再使用を妨げることがあることである。

NPCMの充分な可溶化またはそれ以上の可溶化を達成するには、消化工程は、普通初期細胞のNPCMの約6~10重量%を占める磷脂質類を可溶化するためにホスホリパーゼ酵素を用いての消化処理段階を含みうる。

酵素消化は、酵素組成物を添加した細胞懸濁液を所要温度及び6.5~9.0の範囲のpHに、所要の処理度を達成するまで、維持することによつて行なうのが好ましく、この時間は、通常約0.2~2時間であらう。

酵素消化はいくつかの段階にわけて実施してよく、例えば最初の段階では一つの酵素組成物を用い、次いで同一または異なる酵素組成物を用いる一またはそれ以上の処理段階を実施しうる。しかしながら、1種よりも多くの酵素を使用する場合には、一つの酵素混合物を用いて単一の段階で細胞を処理するのが、便宜でありうる。

実際に、我々は、若干の場合には酵素混合物を用いると相乗効果が得られ、従つて酵素同志が相互に消化し合わないならば、若干の場合には酵素混合物を使用すると、酵素を単独でまたは順々に使用する場合よりもNPCMの高度の可溶化がもたらされることを、発見した。

酵素、例えば蛋白分解酵素及び/またはホスホリパーゼ酵素の必要量は、酵素の種類及び活性に依存するものであり、典型的には蛋白分解酵素の量は、初期所細胞中のNPCMの100g当り0.5~10Anson単位(AU)、好ましくは1~6AUを与えるような量である。

蛋白分解酵素の活性は、変性ヘモグロビンを酵素で25℃及びpH7.5において10分間消化すること

により測定しうる。1AUは、1ミリ当量のチロシンと同じ色をフェノール試薬で呈する量のTCA可溶生成物を1分当り（初期速度において）放出させる酵素量である。この分析法の詳細な説明はノボ・インダストリイ（Novo Industries）発行のリーフレットAF4に与えられている。

リゾチウムのようなある種の酵素はペプチドグリカン可溶化させるけれども、我々は、NPCM中のペプチドグリカンの可溶化をほとんどまたは全く行われない酵素組成物を、少なくとも初期の消化段階においても用いるのが望ましいことを、発見した。この理由は、もしペプチドグリカンが可溶化されると、可溶化された物質からの不溶性HBポリマー顆粒の分離が一層困難になる傾向があるからである。その場合ペプチドグリカンがHBポリマー顆粒の集塊体を包み込むある種の網または袋状物を形成するのではないかと考えられる。そのような集塊体は水性媒からは、集塊から解かれた顆粒よりも容易に分離されうる。ペプチドグリカンの存在は、HBポリマーを含む不溶性残留物のジアミノピメリン酸含量を測定することにより確認できる。

前述のように、NPCMの可溶化は、可溶化剤として界面活性剤を使用することによつてもなしうるものであり、これは好ましくは蛋白分解酵素消化工程の後に実施する。界面活性剤、例えば硫酸化またはスルホン酸化脂肪酸（殊に硫酸ドデシルナトリウム塩）のようなアニオン系界面活性剤を用いての可溶化は、界面活性剤を添加した懸濁液を80℃以上の温度に加熱することにより実施するのが好ましい。界面活性剤の使用量は懸濁液中に残っているNPCMの10~20重量%であるのが好ましい。界面活性剤に対してエチレンジアミン四酢酸のような錯化剤を添加することは、NPCMの可溶化を助長する点で有利でありうる。

我々は界面活性剤処理を酵素消化の後に実施する若干の場合、殊に酵素消化に先立つ熱処理が特には苛酷でない場合（例えば温度が100℃を越えない場合）には、そのような界面活性剤処理のときにエマルジョンが形成されうること、そしてそのようなエマルジョンからは固型分が極めて分離され難いこと、を発見した。我々は、そのようなエマルジョンにカチオン系凝集剤または電解質を

添加してもその分離の助長には余り効果的でないことを発見した。しかし、pH 2 以下までの酸性化、または珪藻土のような吸収剤鉱物の添加は分離を助長する。しかし酸性化は、界面活性剤で可溶化されたNPCMのいく分かの沈澱を生じさせることがある。

消化工程後に残る不溶性残留物は、HBポリマーと共にいく分かの残留未溶解NPCMを含んでいる。

いずれかの所与の段階におけるNPCMの可溶化度は、初期細胞と当該段階で得られるHBポリマー含有組成物とそれぞれのHBポリマー含量から都合よく計算できる。この計算の目的のためには、損失がないこと及びHBポリマーは全く可溶化されなかったこと、を仮定する。

かくして、初期細胞が $P_0$ 重量%のHBポリマーを含み、当該段階の生成物が $P_1$ 重量%のHBポリマー含量をもつとすれば、可溶化されたNPCMの百分率Nは下式によつて与えられる。

$$N = \left( 1 - \frac{P_0(100 - P_1)}{P_1(100 - P_0)} \right) \times 100$$

熱処理及び消化工程は、初期細胞のNPCMの少なくとも50重量%が可溶化され、かつ残留物が少なくとも70重量%、好ましくは少なくとも85重量%のHBポリマーを含む、ように実施するのが好ましい。

これを達成するのに必要とされる消化の量は、もちろん微生物細胞の初期HBポリマー含量 $P_0$ に依存することになる。微生物は、HBポリマー含量 $P_0$ が少なくとも50重量%となるような条件下で培養するのが好ましい。しかし前述のように経済的な考慮から、細胞のHBポリマー含量 $P_0$ は80重量%以下に限定されうる。

本発明の好ましい一態様においては、酵素及び/または界面活性剤によるNPCMの可溶化の後、残渣を過酸化水素で処理する。蛋白性NPCMの大部分が蛋白分解酵素で可溶化されてしまっている場合、過酸化水素による処理は、さらに行われる残留NPCMの可溶化に対してほとんどまたは全く影響を与えず、そしてHBポリマー含有残渣の着色の除去に望ましいものである。過酸化水素による処理は、HBポリマー含有残渣を水性培地から（例えば汙過により）一層容易に分離できるようにすることにより利点をもたらす

うる。

その他の場合（例えば蛋白性NPCMの一部分だけを可溶化するのに蛋白分解酵素による消化処理を用いた場合、及び/または界面活性剤による消化処理を採用した場合）、過酸化水素処理によつて、追加量のNPCMの除去を行ないうる。

HBポリマー含有残渣のNPCMが脂質を含む場合、例えばホスハリハーゼ酵素を用いての消化を実施しなかつた場合、脂質を溶解するがHBポリマーを溶解しえない溶剤、例えばメタノール、でそのHBポリマー含有残渣を洗浄することにより、脂質を除去できる。そのような溶剤洗浄工程は、脱臭工程として望ましいことがある。

上記の操作によつて、不溶性の残渣が得られ、このものは普通少なくとも70重量%、好ましくは少なくとも85重量%、殊に少なくとも90重量%のHBポリマーを含む。

前述のようにペプチドグリカンの顕著な可溶化を行なわないのが好ましい。従つて、好ましい生成物は少なくとも90重量%のHBポリマー及び少なくとも1重量%、殊に1～3重量%のペプチドグリカンを含む。好ましくはそのような生成物の蛋白性物質の含量は6重量%以下である。

若干の場合、消化工程からの生成物は、そのまま、例えば成形材料として使用できる。別法として、HBポリマーは、HBポリマーに対する溶剤、殊に塩化メチレン、クロロホルム、または1, 2-ジクロルエタンのようなハロゲン化炭化水素を用いての溶剤抽出により抽出できる。NPCMの残留割合は小さいので、例えば汙過によるシロップからのNPCMの分離は、直接溶剤抽出法におけるよりもはるかに容易であり、従つてさらに濃厚なシロップ、例えば5～15重量%のポリマーを含むシロップを採用できる。それ故、抽出溶剤の必要な割合を削減でき、従つて不完全な溶剤回収による溶剤損失を低減できる。

#### 実施例

本発明を以下の実施例でさらに説明する。実施例中におけるすべての%は重量基準で示されている。実施例1～5、7～16及び18～19で使用した懸濁液は、基質としてグルコースを用い窒素制限下での連続培養で増殖したアルカリゲネス・オイトロフス（*Alcalignes eutrophus* NCIB寄託第11599号）の培養液の遠心分離によつて得られた

ものであった。

#### 実施例 1

この実施例では、約60%の3-ヒドロキシブチレートホモポリマー (PHB) 含量の細胞を50 g/lの濃度で含むいくつかの懸濁液を、100℃ 5において還流条件下で種々の時間にわたり沸とうした。次いでそれらの懸濁液を冷却し、トリス(ヒドロキシメチル) アミノメタン・塩酸塩を緩衝剤として添加し、50mMの緩衝剤濃度とした。次いでこれらの緩衝剤処理懸濁液を、初期細胞乾燥重量に基き1%の蛋白分解酵素組成物を用いて、55℃及びpH8.2において1時間温置した。ここで用いた蛋白分解酵素組成物は、ノボ(Novo) インダストリス社から入手した「アルカラゼ (Alcalase: 商標) 0.6L」であり、同社発行のセールス文献では0.6AU/gの活性を有するとされている。この「アルカラゼ」の量は、初期細胞中のNPCMの100g当り約1.5AUに相当する。 15

結果の消化剤の懸濁液の試料を氷冷水で稀釈し、次いで20000Gにおいて1~2分間遠心分離した。得られた遠心分離ペレットを水で3回洗浄し、次いでそれらの蛋白含量を、J.Biol.Chem. 193 (1951) 265にロウリイ (Lowry) 等が発表した比色分析法に基く方法によつて測定した。結果を以下に示す。 25

沸とう時間 (分)	蛋白含量 (%)	備考
1	7.7	粘稠懸濁液、これは遠心分離のときにペレットを形成し難い。
5	6.2	粘稠度は低い、なおペレットを形成し難い。
10	5.8	易動性懸濁液であり、ペレットを容易に形成した
30	5.6	
60	5.5	

アミノ酸分析法による蛋白分析値と比較したところ、比色分析法はアミノ酸分析法で得られた値の約75%の値を与えることが判った。

#### 実施例 2

熱処理段階の効果は、熱処理後、いずれの酵素処理もしない前の懸濁液の沈降速度を測定するこ

とによつても評定できる。

使用した水性懸濁液は72%のPHBを含む細胞を20g/lの濃度で含んでいた。この懸濁液をオートクレーブ中で5分間加熱することにより熱処理し、次いで100rpmにおいてストローブ遠心分離機で遠心分離した。いろいろな遠心処理時間経過後に固型分/液体界面の高さを測定した。

オートクレーブ温度 ℃	t分間の遠心分離後の固型分/液体界面の高さ(cm)					
	t=0	3	5	10	15	20
100	約7	—	6.7	6.4	6.0	5.6
120	約7	—	6.0	4.8	3.0	1.3
140	約7	<1	—	—	—	—

温度が高ければ高いほど、分離が一層容易に行なわれることが判る。

#### 実施例 3

実施例1の操作を繰返えしたが、本例ではPHB含量52%の細胞を50g/l含む懸濁液を用いた。沸とうは10分間行なつた。磷脂質を除去するために、「アルカラゼ」による消化後、懸濁液を、種々の量のホスホリパーゼ酵素組成物を添加して、40℃で、pH8.6において1時間温置した。ホスホリパーゼ酵素組成物は、ノボ・インダストリス社の「レシターゼ (Lecitase) 100S」であつた。 30

「レシターゼ」処理の前後の生成物の蛋白含量を実施例1のように測定し、そして磷脂質を溶剤抽出しその抽出を酵素法で検定することにより、残留磷脂質含量を測定した。その酵素による検定法では、ホスホリパーゼC酵素を用いた。これは、ホスファチジルエタノールアミン以外のホスファチド類を比較的遅く加水分解するので、存在する磷脂質の約50%だけがこの方法で検出される。従つて下記の表においては、全磷脂質ではなくホスファチジルエタノールアミン含量と表示してある。 35

比較のため、上記の操作を、「アルカラゼ」消化を省略して、繰返えした。

「レシターゼ」 濃度*	「アルカ ラーゼ」 処理	生成物分析値(%)			可 溶 化 NPCMの割 合 (%)**
		PHB	蛋白	ホスファチ ジルエタノ ールアミン	
0.025	有	83	10.4	0.4	65
0.25	有	88	11.0	0.1	75
0.19	なし	62	—	0.4	21
1.9	なし	65	—	0.2	27
初期細胞	なし	52	—	2.2	0
熱処理及び「ア ルカラーゼ」消 化	有	79	12.9	1.5	56

※ 初期細胞乾燥重量に基く重量%

\*\* 生成物及び初期細胞のPHB含量から計算

低いホスファチジルエタノールアミンのレベルを達成しうるけれども、熱処理と「レシターゼ」消化とだけでは、比較的多量の「レシターゼ」を用いた場合であつて、70%以上のポリマーを含む生成物を与えるに足るNPCMを可溶化しえないことが判る。しかし「アルカラーゼ」処理後に「レシターゼ」処理を行なうと、ポリマー純度の著しい向上を達成可能とし、「レシターゼ」は少量の蛋白のみの可溶化に影響を与える。

#### 実施例 4

本例では「アルカラーゼ0.6L」蛋白分解酵素の種々の濃度の比較及び種々の消化時間の比較を行なう。

実施例 1 と操作を繰返した。本例では沸とう時間を 1 時間とし、次いで種々の濃度の「アルカラーゼ0.6L」で消化した。各消化処理から一定時間毎に試料を採取して、比色分析法により蛋白分析した。生成物の実際の蛋白含量ではなく、「可溶化された、初期細胞中の蛋白の割合」を下表に示す。

酵素濃度		消化 時間 (分)	可溶化され た初期蛋白 の割合(%)
(%)※	(AU/100gNPCM)		
0.64	1.0	10	32
		20	41
		30	42
		60	46
0.75	1.1	10	35
		20	44
		30	51
		60	52
1.0	1.5	10	38
		20	46
		30	53
		60	57
1.2	1.8	10	48
		20	53
		30	58
		60	58

※ 初期細胞の重量に基く。

#### 実施例 5

本例では、界面活性剤による消化の効果を評定する。

使用した細胞懸濁液は実施例 3 のものと同一であつた。下記の処理を採用した。

A 還流条件下に100℃で 1 時間沸とう。

B 細胞乾燥重量に基き10%の硫酸ドデシルナト

酵素濃度		消化 時間 (分)	可溶化され た初期蛋白 の割合(%)
(%)※	(AU/100gNPCM)		
0.43	0.6	10	27
		20	34
		30	33
		60	38

リウム塩の添加、次いで還流条件下に100℃で1時間沸とう。

C Bと同様、但し、5 mMの溶液を与えるのに足るエチレンジアミン四酢酸を添加してから沸とう。

D Aと同様、次いで細胞乾燥重量に基き1%の「アルカラーゼ0.6L」を添加し、55℃、pH8.2で1時間消化。

\*E Dと同様、次いでBを実施。

F Dと同様、次いでCを実施。

本実施例では、蛋白含量をアミノ酸分析法で測定した。ジアミノピメリン酸含量は、残留ペプチドグリカンの濃度の指標を与える。ペプチドグリカン含量は、表示したジアミノピメリン酸含量のほぼ5倍である。

\*

処理			生成物分析値(%)				
沸とう	「アルカラーゼ」消化	硫酸ドデシルナトリウム塩及び沸とう	PHB	蛋白	D.P.A.	P.E.	N.A.
なし	なし	なし	52	25.4	0.24	2.2	
有	なし	なし	72	16.8	0.25	0.9	0.6
なし	なし	有	93	4.4	0.24	0.4	0.28
なし	なし	有(+EDTA)	94	3.8	0.25	0.3	<0.05
有	有	なし	61	5.2	0.24	0.9	0.5
有	有	有	96	2.5	0.25	0.4	0.06
有	有	有(+EDTA)	97	2.4	0.26	0.2	<0.05

D.P.A.=ジアミノピメリン酸

P.E.=ホスファチジルエタノールアミン

N.A.=核酸類

EDTA=エチレンジアミン四酢酸

上記の種々の処理は著しく低減した蛋白濃度を与えたけれども、ジアミノピメリン酸含量はペプチドグリカンがほとんど可溶化されなかったことを示している、ことが判る。

もう一つの実験では、PHB含量60%の細胞を50 g/l濃度で含む懸濁液を上記処理Fに付したところ、同様な結果を得た。処理Fの後に「アルカラーゼ」または硫酸ドデシルナトリウム塩を用いてさらに消化しても、生成物の純度の著しい改善はなかった。

#### 実施例 6

この実施例では、グルコースとプロピオン酸との混合物を基質として用いた窒素制限下で連続培養により増殖されたアルカリゲネス・オイトロフス(NCIB寄託第11599号)の培養液を遠心分離することにより得た、3-ヒドロキシブチレート/3-ヒドロキシバレレート共重合体(10モル%の3-ヒドロキシバレレート単位を含む)を48%含む該微生物細胞を50 g/lの濃度で含む懸濁

液を使用した。

実施例5の処理Fを繰返したが、本例では「アルカラーゼ」消化の前の最初の沸とうは1時間ではなく10分間行なった。硫酸ドデシルナトリウム塩による消化後に生成物をいくつかの部分に分割して、遠心分離してペレットを得た。

1個のペレットを、50 mM磷酸塩緩衝液(既にEDTAが1 mMの濃度で添加されていた)に懸濁させた。ペレットの重量に基き0.1%の卵白リゾチーム〔シグマ・ケミカルス(Sigma Chemicals)社製〕を加え、その懸濁液を20℃及びpH6.5で1時間消化した。

もう1個のペレットを、1 mMのEDTAを添加した50 mMの酢酸塩緩衝液中に懸濁させ、ペレットの重量に基き0.1%の「ノボチーム(Novozyme) 234」(ノボ・インダストリス社製)を加え、その懸濁液を50℃及びpH4.5で1時間消化した。

もう1個のペレットを0.1M水酸化ナトリウム

水溶液中で20℃において1時間消化した。このアルカリ消化処理を、上記リゾチーム及び「ノボチ\*

ーム」による消化から得られたそれぞれの生成物にも適用した。

処理				生成物分析値(%)		
沸とう、「アルカラーゼ」消化、硫酸ドデシルナトリウム塩消化	リゾチーム	「ノボチーム」	アルカリ	HB/HVコポリマー	蛋白※	DPA
有	なし	なし	なし	86	6.7	0.5
有	なし	なし	有	91	6.9	0.5
有	有	なし	なし	90	6.0	<0.03
有	有	なし	有	95	4.3	<0.03
有	なし	有	なし	89	6.4	0.5
有	なし	有	有	89	6.2	0.5

※ アミノ酸分析による。

リゾチームがジアミノピメリン酸含量を著しく低減させたことが判る。アルカリ処理及び「ノボチーム」はジアミノピメリン酸の含量には著しい効果を示さないけれども、アルカリ処理を単独で採用した場合またはアルカリ処理をリゾチームの後に採用した場合にはHBポリマーの純度が向上した。

#### 実施例 7-11

これらの実施例では懸濁液は、PHB含量79%の細胞を90g/lの濃度で含むものであつた。

懸濁液をオートクレーブ中で加圧スチームを吹き込み3分間14℃に加熱することにより加熱処理\*

した。次いでこの懸濁液を冷却し、遠心分離した。

固型残渣の分割部分を水に再懸濁して、固型分含量50g/lの懸濁液(複数)を作つた。これらの懸濁液に種々の市販酵素組成物を添加して、懸濁液を、それぞれの酵素組成物供給業者によつて推奨されるpH値(必要により水酸化ナトリウムの添加により調節)において50℃で60分間消化した。

次いで不活性残渣を遠心分離によつて水性媒体から分離し、脱イオン水で洗浄した。結果を下表に示す。

実施例	酵素	酵素濃度(g/l)	pH	残渣のPHB含量(%)	可溶性NPCMの割合※※(%)
7	「プロテアーゼ」J.330※	0.5	8.5	93	72
8	「エスパラーゼ」J.0L <sup>+</sup>	0.5	8.5	89	54
9	「アルカラーゼ」J.6L <sup>+</sup>	0.5	8.5	88	49
10	「ニュウトラーゼ」J.5L <sup>+</sup>	0.5	7.0	87	44
11	「アルカラーゼ」J.6L <sup>+</sup>	0.25	7.0	91	63
	「ニュウトラーゼ」J.5L <sup>+</sup>	0.25			

※ マイルズ社(英国)製

+ ノボ・エンザイム社(英国)製

※※ 生成物及び初期細胞のPHB含量から計算。

実施例9及び10の生成物中のNPCMは、残渣をさらに酵素消化及び/または界面活性剤による消化に付すことにより、さらに可溶化できた。

実施例11を、実施例9及び10と比較することに

より、蛋白分解酵素の混合物を使用すると、個々の酵素の同等量を用いた場合よりもすぐれたNPCM可溶化ができることが判る。

実施例 12



実施例11の生成物を水に再懸濁させた。「ニュウトラゼ (Neutrase) 0.5L」の0.25g/lを「アルカラーゼ0.6L」の0.25g/lと組合せたものを用いて、上記懸濁液を50℃及びpH7.0において60分間消化した。残渣を遠心分離によつて水性媒から分離し、脱イオン水で洗浄した。残渣は96%のPHBを含んでいた。これは84%の総合NPCM可溶化に相当する。

#### 実施例 13~16

実施例 7~11の操作を繰返したが、PHB含量75%の細胞の懸濁液を用い、種々の蛋白分解酵素組成物を用い、そして消化処理はそれぞれの酵素組成物供給業者によつて推奨される温度においてpH7で60分間実施した。各例において使用した酵素組成物の量は初期細胞乾燥重量に基き1%であつた。

実施例	酵素	温度℃	残渣のPHB含量(%)	可溶化NPCMの割合(%)
13	ブロメリン・コンセントレート	55	89	63
14	ババイン30000	70	89	63
15	オールプロテアーゼ	50	84	43
16	「ハイT」	32	80	25

ブロメリン・コンセントレート (活性1295BTU/g; バイナツブルの幹から得られる) 及びババイン (活性30000PU/mg; ババイヤ果実から得られる) の両者は、米国インディアナ州エルハートのマイルス・タカミネから供給されたものである。「オールプロテアーゼ (Allprotease)」及び「ハイ (High) T」は米国ケンタツキ州レキシントンのオール・テク (All-Tech) 社から供給されたものである。「オールプロテアーゼ」は、真菌、細菌及び植物の酵素の混合物であるが、「ハイT」はバシラス・リケニホルミス (*B. licheniformis*) から得られる。

#### 実施例 17

この実施例で使用した懸濁液は、基質としてメタノールを用い窒素制限下での回分式培養により得られたメスロバクテリウム・オルガノフィルム (*Methlobacterium organophilum*; NCIB寄託第11483号) の細胞懸濁液であつた。細胞は17%

のPHBを含んでいた。

実施例 7~16の操作を繰返したが、本例では、0.5%の「アルカラーゼ0.6L」及び0.5%の「ニュウトラゼ0.5L」(それぞれ初期細胞乾燥重量に基く%) の混合物を酵素組成物として使用し、消化時間60分、pH7.0、温度55℃を用いた。生成物をさらに複数の消化段階に付した。その際に同じ条件を用い、各消化毎に新しい酵素を用い、そして消化段階の間で生成物を遠心分離し、脱イオン水に再懸濁させた。

結果は下記の通りであつた。

消化処理の回数	生成物のPHB含量(%)	可溶化された全NPCMの割合(%)
1	36	64
2	40	69
3	55	83

#### 実施例 18

この実施例で用いた懸濁液は、PHB含量5%の細胞を100g/lの濃度で含んでいた。

500mlの懸濁液を第1の攪拌機付きオートクレーブに仕込んだ。同量の水を第2の攪拌機付きオートクレーブに仕込み、窒素圧下に350℃に加熱した。第1のオートクレーブは、第2のオートクレーブ内の圧力を越える圧力まで窒素で加圧し、次いで第1のオートクレーブの内容物をその超過窒素圧の力によつて第2のオートクレーブ中へ圧入した。第2のオートクレーブの併合内容物を2時間激しく混合した。第2のオートクレーブ中の併合内容物の温度はほぼ170℃であつたが、加えられた圧力は液体状態を維持するに足る値であつた。次いで第2のオートクレーブの内容物を窒素圧によつて、大気圧の捕集容器中へ押し出した。

得られた生成物を遠心分離し、遠心分離ペレットを500mlの脱イオン水に再懸濁させ、次いでその懸濁液に0.5gの「アルカラーゼ0.6L」を添加した。懸濁液を55℃及びpH7において30分間保持した。次いで懸濁液を5000Gにおいて10分間遠心分離した。遠心分離ペレットを、次いで500mlの脱イオン水に再懸濁した。5g、すなわち残留NPCMの約107%の硫酸ドデシルナトリウム塩を加え、懸濁液を100℃で1時間加熱した。次いで懸濁液を5000Gで10分間遠心分離してペレットを

得て、これを脱イオン水で2回洗浄した（それらの洗浄の間にペレットを遠心分離により回収した）。最後に乾燥した褐色の生成物（生成物A）を得た。

上記の操作を繰返えしたが、「アルカラーゼ」消化段階と「レシターゼ」消化段階を併合して行ない、消化のために0.5gの「アルカラーゼ」及び0.5gの「レシターゼ」の混合物を用いた。

処理						PHB含量 %	可溶化NPCMの割合(%)*
H	A	L	A+L	S	W		
X	X	X	X	X	X	57	0
✓	X	X	X	X	X	61	15
✓	✓	X	X	X	X	79	65
✓	✓	✓	X	X	X	86	78
✓	✓	✓	X	✓	X	93	90
✓	✓	✓	X	✓	✓	95	93
✓	X	X	✓	X	X	80	67
✓	X	X	✓	✓	X	91	87
✓	X	X	✓	✓	✓	94	92

H=熱処理

A=「アルカラーゼ」消化

L=「レシターゼ」消化

A+L=「アルカラーゼ」及び「レシターゼ」を同時に用いて消化

S=硫酸ドデシルナトリウム塩消化

W=最終洗浄

※ 生成物及び初期細胞のPHB含量から計算

「アルカラーゼ」消化処理を初期懸濁液に直接に実施すると（すなわち熱処理工程を省略して実施すると）、懸濁液は極めて粘稠になり、攪拌することができず、または不溶性部分を分離するための処理もできなかつた。

前記の褐色の生成物Aの1部を、還流条件下で10部の塩化メチレンによつて抽出し、得られたシロップを濾過した。このシロップの高粘度にもかかわらず、三酢酸セルロースフィルム製造に採用される如き標準的なシロップ濾過法が使用できた。その理由は、除去されるべきNPCMの割合がシロップの約0.5%にすぎないからであつた。

濾過後のシロップはキャストとしてPHBフィルムを作ることができた。

シロップの一部を石油エーテルに加えて、HB

ポリマーを沈澱させて微細白色粉末(B)を得た。

生成物A及び粉末Bのそれぞれの試料を下記の方法で溶融押出した：

3.5gの試料を、直径2mm、ランド長8mmの円形オリフィスをもつダイを備えたメルトフローレーダー（英国ウエルウィン、デイブテスト社製）のパレルに仕込んだ。パレルは190℃に維持した。5分間のウォーミング・アップ時間後に10kgの荷重をピストンに掛けた（ピストンの重量0.16kg）。メルトフロー時間は、合計2gの試料がダイを介して押出されるに必要な合計時間（上記5分間のウォーミング・アップ時間を含む）である。

メルトフロー時間は下記の通りであつた。

15 生成物A 10.5分

粉末B 8.0分

比較のために述べると、欧州特許第15123号明細書に記載される如き噴霧乾燥/液体抽出/溶剤抽出法によつてアルカリゲネス・オイトロフス細胞から分離されたPHB試料のメルトフロー時間は、典型的には8～10分の範囲である。このことは、上記塩化メチレン抽出工程の前または後のいずれのポリマーのメルト安定性も、直接溶剤抽出ルートによつて抽出されたポリマーのそれと同等であることを、示している。

生成物Aは、ゲル透過クロマトグラフィーで測定して約1000000の重量平均分子量を有した。

比較のため、本例の出発原料として用いたものと同じ懸濁液から、次亜鉛素酸ナトリウム（細胞乾燥重量に基き15%）を用いて40℃で30分間消化することによりPHBを抽出した場合には、わずかに約101000の重量平均分子量の生成物が得られた。このことは、過塩素酸塩による消化はポリマーの著しい分解をもたらすことを示している。

35 実施例 19

この実施例で使用した懸濁液は実施例18で使用したものと同一であつた。500mlの懸濁液を、その中に浸したスチーム加熱コイルによつて80℃に加熱し、次いで55℃まで冷却した。実施例18に記載の「アルカラーゼ」、「レシターゼ」及び硫酸ドデシルナトリウム塩による処理を順に実施した。

懸濁液は「アルカラーゼ」消化後にわずかに粘稠になつたが、それでもなお攪拌可能であつた。しかし「アルカラーゼ」消化及び「レシターゼ」消

化」のそれぞれの後の遠心分離段階は、さらに困難であつた。その理由はフロックが極めてデリケートであつて、実施例18で得られた堅いペレットとは異なりゲル状のペレットが得られた。しかし硫酸ドデシルナトリウム塩での処理後には安定な懸濁液が形成され、このものは遠心分離によつて\*

\*容易に分離できた。この懸濁液の沈降特性を調べるため、その20ml宛を試験管に入れて、懸濁液の高さ6cmの垂直カラムを与えた。種々の添加剤を懸濁液に添加し、種々の時間経過後に固体/液体界面の高さを観察した。結果を下記の表に示す。

添加剤	変性懸濁液のpH	T時間後の界面の高さ(cm)			
		T=0	T=2	T=4	T=18
なし	7.2	—	—	—	4.2
0.02g「アクアフロック」4051	7.2	—	—	—	3.0
0.02g「アクアフロック」4067	7.2	—	—	—	3.0
0.5gCaCl <sub>2</sub>	7.2	—	—	5.9	4.8
0.2g珪藻土	7.2	—	4.0	3.5	2.8
HCl	4.46	—	—	5.6	5.2
HCl	3.40	—	—	5.6	5.0
HCl	1.75	—	5.5	5.3	3.7
HCl	1.60	—	4.5	3.5	2.5

— = 界面なし

電解質 (CaCl<sub>2</sub>) またはカチオン系凝集剤「アクアフロック ; Aquaflock」4051 または 4067) は効果を示さないが、珪藻土または多量の HCl の添加は pH を 2 以下に下げて沈降を生じさせることが判る。

同様な懸濁液のカラムの低い重力加速度(G)における遠心分離も、未変性懸濁液、及び HCl で pH 1.60 に酸性化した懸濁液について実施した。

500G での種々の遠心分離時間後の界面の高さを下表に示す。

遠心分離時間 (分)	界面の高さ(cm)	
	pH7.2	pH1.6
0	—	—
2	5.9	5.6
3	5.9	4.8
4	5.8	4.1
5	5.7	3.6
10	5.1	2.4
15	4.3	1.9
20	3.6	1.6
30	2.8	1.4

アルカリゲネス・オイトロフス (NICB 寄託第 11599 号) を水性媒地中で、グルコース及びプロピオン酸の混合物を基質とし窒素条件下に回分培養し、3-ヒドロキシブチレート (HB) / 3-ヒドロキシバレレート (HV) コポリマー (HB : HV のモル比 = 49 : 1) を 71% 含む細胞を 21 g / ℓ の濃度で含む培養液を得た。

培養液を培養器から、135℃ に維持した滅菌器を介して、次いで 70℃ の冷却器を介して 130 ℓ / 時の流量で貯蔵容器中へ送った。滅菌器での滞留時間は約 7 分であつた。

貯蔵容器中の培養液の pH を 8 に調節し、次いで温度が 50℃ に降下したときに 0.2 g / ℓ の「アルカラーゼ 0.6L」を添加した。その混合物を貯蔵器中に 1 晩放置した。その間に混合物の温度は 27℃ に下がった。次いで混合物を遠心分離した。固体残渣の HB コポリマー含量は 84% であり、これは NPCM の 53% の可溶性に相当するものである。この残渣を水に再懸濁して、固型分含量 20 g / ℓ の懸濁液を作り、次いでこの懸濁液を二つの部分に分解し、別々に処理した。

A 第 1 の部分に 0.2 g / ℓ の「アルカラーゼ 0.6L」に添加し、その混合物を 55℃ で pH 8 において 1 時間消化し、次いで遠心分離した。残渣

のHBコポリマー含量は92%であり、これはNPCMの79%の可溶化に相当するものであった。

この残渣を次いで水に懸濁して、約260g/lの固型分含量とし、10vol%過酸化水素500ml/lを用いて80℃で2時間消化した。この脱色した残渣を遠心分離によつて分離し、水洗し、乾燥した。この残渣のHBコポリマー含量は92%であつた。これは過酸化水素処理がNPCMをさらに可溶化しなかつたことを示している。

B 前記2分割懸濁液の第2の部分に2g/lの硫酸ドデシルナトリウム塩を添加し、その混合物を1時間沸とう加熱した。次いでこの混合物を遠心分離し、87%のHBコポリマー含量の残渣を得た。この数値はNPCMの63%の可溶化に相当する。

この残渣を二つの部分に分割し、別々に処理した。

I 残渣の第1の部分を水に懸濁して約190g/lの固型分含量の懸濁液とし、10vol%過酸化水素を500ml/lの量で用いて80℃で2時間消化処理した。脱色残渣を遠心分離で分離し、水洗し、乾燥した。この乾燥残渣をHBコポリマー含量は96%であり、これはNPCMの90%の総合可溶化に相当するものであつた。

II 残渣の第2の部分をメタノールで洗浄し、次いで水洗した後、遠心分離で分離した。この残渣のHBコポリマー含量は93%であり、これはNPCMの82%の可溶化に相当するものであつた。この湿潤残渣を水に再懸濁して、200g/lの固型分含量とし、10vol%過酸化水素を500ml/lの濃度で用いて80℃において2時間消化した。得られた脱色スラリーを遠心分離して、残渣を得て、次いでこれを水で洗浄し、乾燥し

た。この乾燥残渣のHBコポリマー含量は98%であり、これはNPCMの95%の可溶化に相当するものであつた。

#### 実施例 21

5 アルカリゲネス・オイトロフス (NCIB寄託第11599号) を、グルコース及びプロピオン酸の混合物を基質として窒素制限下に水性培地中で回分式培養して、HB/HVコポリマー (HB:HVモル比=4:1) を75%含む細胞を45g/lの濃度10 で含む懸濁液を得た。

(この実施例では、酵素及び界面活性剤の量を初期細胞乾燥重量に基く%を表わす。)

懸濁液をパイプを介して流し、このパイプにスチームを吹き込んで150℃に加熱した。150℃における滞留時間は20秒であつた。得られた懸濁液を70℃に冷却し、その温度において0.5%の「アルカラーゼ0.6L」及び0.5%の「ニュウトラーゼ0.5L」の混合物を用いてpH7.5で2時間消化した。

得られた懸濁液を遠心分離によつて濃縮し、次いで3%の硫酸ドデシルナトリウム塩を添加し、還流条件下に100℃で2時間沸とうした。

結果の懸濁液を次いで噴霧乾燥した。噴霧乾燥粉末を還流条件下にメタノールで洗浄し、濾過し、乾燥した。上記のいろいろな段階における25 HBポリマー含量を次表に示す。

	残渣のHB ポリマー 含量(%)	可溶化NP CMの割合 (%)
「アルカラーゼ」/「ニュウトラーゼ」消化後	88	59
「プロテアーゼ」消化後	92	74
メタノール洗浄後	93	77

※ 生成物及び初期細胞のそれぞれのHBポリマー含量から計算。